

Title	Two Cis-acting Elements in the 3' untranslated Region of $\alpha$ CaMKII Regulate its Dendritic Targeting
Author(s)	森, 泰丈
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42632">https://hdl.handle.net/11094/42632</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照</a> ください。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	もり 森 やす 泰 たけ 丈
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 0 1 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 13 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学 位 論 文 名	Two Cis-acting Elements in the 3'untranslated Region of $\alpha$ CaMK II Regulate its Dendritic Targeting ( $\alpha$ CaMK II mRNA の 3' 非翻訳領域に存在する 2 つのシス領域が樹状突起への同 mRNA の局在を決定する)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 遠 山 正 彌  (副査) 教 授 岡 野 栄 之    教 授 米 田 悦 啓

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein kinase II  $\alpha$ -subunit ( $\alpha$  CaMK II) は神経特異的なリン酸化酵素であり、長期増強現象をはじめとする神経細胞の生理機能に重要な役割を果たしていることが知られている。興味深いことに、この mRNA は神経細胞の細胞体だけでなく樹状突起の先端にまで分布することが報告されており、入力刺激に応じたシナプス後膜での蛋白質合成 (local protein synthesis) に関与していると考えられている。これまでトランスジェニックマウスを用いた実験から、 $\alpha$  CaMK II mRNA の樹状突起へのターゲティングにはそれ自身の 3' 非翻訳領域 (3' UTR) が必要であることが証明されている。我々は  $\alpha$  CaMK II mRNA の輸送機構、さらに mRNA が樹状突起に局在することの生理学的意義を明らかにする目的で、 $\alpha$  CaMK II mRNA 内における樹状突起へのターゲティングに不可欠な配列の検索を試みた。

#### 【方法】

コロニーハイブリダイゼーション法でラット脳 cDNA ライブラリーより 3.1kb におよぶ  $\alpha$  CaMK II 3' UTR を取得した。この領域に様々な deletion を加えることで神経細胞内での mRNA の局在がどのように変化するかを in situ hybridization 法を用いて検討した。まず 3' UTR 全長を Green Fluorescence Protein (EGFP) の翻訳領域の下流に融合し、CMV プロモーターにより強制発現させる発現プラスミドを構築した。さらにこの全長 3' UTR に様々なディレーションを与えた 3' UTR や  $\alpha$  CaMK II の翻訳領域を融合したプラスミドを同時に作製し、これらをリポフェクション法により培養 7 日目のラット海馬初代培養細胞に導入した。2～3 日後 EGFP より発せられる蛍光を観察することで融合 mRNA の発現を確認し、GFP 配列のアンチセンスプローブを用いた in situ hybridization で融合 mRNA の細胞内局在を検討した。

#### 【結果】

EGFP 翻訳領域のみをコードする mRNA は、約 90% 以上の発現細胞において細胞体から 20  $\mu$ m 以内の樹状突起内に局在することを確認した。一方 EGFP 翻訳領域に  $\alpha$  CaMK II 3' UTR の 5' 側 94 塩基を付加すると、50% 以上の細胞において融合 mRNA は樹状突起のさらに末梢へ移動することを確認した。この現象はさらに付加する 3' UTR を 830 塩基にまで伸長しても観察することができた。

しかしさらに  $\alpha$  CaMK II 3' UTR の 5' 側の 1000 塩基以上の領域や 3' UTR の全長を付加すると、殆どの発現細胞に

において樹状突起への局在は失われた。しかし25mM KClで3時間処理することで脱分極を起こさせた細胞においては、1000塩基以上の3' UTRを付加した融合 mRNA であっても40%以上の細胞で樹状突起への輸送が起ることを確認した。さらに5'側の94塩基を除去した3' UTRを付加した融合 mRNA では脱分極刺激を加えた後も樹状突起への移動を示さなかった。以上より $\alpha$ CaMK II 3' UTRの樹状突起への局在には5'末端側の94塩基が必要かつ十分であること、また神経細胞の電気的活動が必要であることが明らかとなった。

この領域とホモロジーを示す配列を検索したところ、同じく樹状突起への局在を示す neurogranin mRNAの3' UTR内に約30塩基にわたって最大80%のホモロジーを示す領域を発見した。この領域は乏突起細胞においてミエリン塩基性蛋白質 mRNA が突起へと輸送されるために必要なシス配列である RTS (RNA Transport Signal) とも一部相同性を有していた。neurogranin 3' UTRについて $\alpha$ CaMK IIと同様の実験を行ったところ、上記の高いホモロジーを示す領域が neurogranin mRNA の樹状突起への局在を決定していることが証明できた。

#### 【総括】

- 1)  $\alpha$ CaMK II mRNA の樹状突起への輸送には、3' UTR上に存在する約30塩基から成るシス配列が不可欠であるが、この配列はさらに3' UTRの下流に存在すると考えられるもう一つの抑制性のシス配列により制御されており、この抑制が神経細胞の電気的活動の増強により解除されることで $\alpha$ CaMK II mRNA は樹状突起内を末梢側へ輸送されと考えられた。
- 2)  $\alpha$ CaMK II mRNA の樹状突起への局在を正に制御するシス領域と約30塩基にわたって約80%のホモロジーを示す領域が neurogranin 3' UTR内に存在し、この配列が mRNA 輸送システムにとって共通の認識配列として機能している可能性が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は樹状突起に局在する mRNA であるカルモジュリン依存性キナーゼ II の $\alpha$ サブユニット ( $\alpha$ CaMK II) mRNA に着目し、神経細胞内における mRNA の輸送メカニズムを明らかにしようとした注目すべき論文である。これまで神経細胞内において mRNA は細胞体に局限して存在するとされていたが、一部の mRNA は選択的に樹状突起や軸索に向けて輸送され、シナプス後膜下に構成的に存在することが明らかになり、その生理学的意義についての研究が進められている。これらの mRNA はシナプスにおける蛋白合成に関与していると考えられているが、現在までのところ神経細胞内での mRNA 輸送メカニズムについて詳細な解析はほとんどなされていない。本論文は樹状突起に分布する mRNA の中で脳の高次機能に重要な役割を果たす $\alpha$ CaMK II mRNA と細胞内輸送系との相互作用が、同 mRNA のどの領域を介して行われているのかを明らかにした。特に樹状突起に局在するために必要かつ十分な最小の領域(シス領域)が $\alpha$ CaMK II mRNA 3' 非翻訳領域の約30塩基に存在することを証明し、さらにこれと相同性の極めて高い領域が樹状突起への局在を示す neurogranin mRNA にも存在し、樹状突起への局在シグナルとして機能することを示した点は高く評価される。もう一つの興味深い点は $\alpha$ CaMK II mRNA の樹状突起への移動が神経細胞の活動電位に依存することを証明したことである。

以上のように本論文は神経細胞における mRNA の輸送システム、またシナプスにおける独立した蛋白合成機構を解明する端緒を開いたと言える論文であり、極めて学術的価値も高いと考えられ、学位の授与に値する研究である。